

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461581

研究課題名(和文) 低分子代謝物質の網羅的解析を応用した急性ウイルス性脳症の新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Comprehensive analysis using metabolome profiling for investigating new biomarkers associated with the pathophysiology of acute viral encephalopathy

研究代表者

伊藤 嘉規 (Ito, Yoshinori)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20373491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：世界的に日本での報告例が多いインフルエンザ脳症、ヒトヘルペスウイルス6型(HHV-6)脳症について、生体内の約3,000種の低分子代謝物質を網羅的に解析するメタボローム解析を応用し、病態解明・バイオマーカーの探索を試みた。血清検体を用いたメタボローム解析からキヌレニンとキノリン酸がバイオマーカー候補と考えられた。組織モデルでの検討から、キノリン酸は血液脳関門における透過性亢進を引き起こすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Influenza-associated encephalopathy and human herpesvirus 6 encephalopathy are common forms of acute encephalitis/encephalopathy in Japan. Comprehensive metabolome profiling, which can analyze around 3,000 metabolites, was applied to discover new aspects of its disease pathophysiology and new potential biomarkers.

As a result of metabolome profiling, kynurenine and quinolinic acid were selected as potential metabolites associated with the pathophysiology of those two encephalopathies. Trans-endothelial electrical resistance of the in vitro blood brain barrier model was significantly decreased after quinolinic acid treatment in culture.

研究分野：小児感染症

キーワード：急性脳症 ヒトヘルペスウイルス6型 インフルエンザ バイオマーカー キヌレニン キノリン酸

1. 研究開始当初の背景

(1)日本における小児期の急性脳炎・脳症においては、インフルエンザ脳症、ヒトヘルペスウイルス 6 型(HHV-6)脳症が、この順に頻度が高い。この2つの脳症は、世界的に日本からの報告例が多いことが特徴である。インフルエンザ脳症では、炎症性サイトカインなどを介して神経障害を起こすことが報告されている。その他、特定の遺伝子の関与や代謝異常との関連を示唆する症例報告はあるが、病態は十分に解明されていない。HHV-6 脳症でも炎症性サイトカインと病態との関連が示唆されているが、病態解明は進展していない。これらの脳症において病態の進行を知ることができるバイオマーカーを探索することは病態解明につながるだけでなく、診療上有用である。

(2)メタボローム解析とは、生体内の約 3,000 種の低分子代謝物質を網羅的に解析する手法である。ゲノムやプロテオーム分析と比べ、解析対象が少なく、表現型に近いと考えられるため、バイオマーカーの探索手法として期待されている。私共は、先行研究から、キヌレニン代謝経路の下流代謝物である、キヌレニンとキノリン酸が有望なバイオマーカー候補であることを見出した。キノリン酸は神経毒性が複数の疾患で報告されている。

2. 研究の目的

(1)インフルエンザ脳症、HHV-6 脳症の臨床検体(血清)のメタボローム解析によって抽出した新規バイオマーカー候補(特にキヌレニン・キノリン酸)その急性期の動態を、より多くの患者群で比較検討することにより、バイオマーカーとしての有用性を明らかにする。特に血清を用いた解析で有用と考えられた、キヌレニン・キノリン酸については、髄液の検討を行い、中枢神経局所におけるバイオマーカー候補の動態を解析する。

(2)キヌレニン・キノリン酸の血清濃度の上昇は、炎症反応によるキヌレニン代謝経路の亢進が関与していることが想定される。そのため、血清中の炎症性サイトカインとの相関を検討する。

(3)生体内で、実際にバイオマーカー候補代謝物の産生がウイルス感染により影響を受けるかについて、培養細胞を利用した実験系で確認する。今回は、サルの初代細胞により構築された、血液脳関門組織モデルを使用し、キヌレニン・キノリン酸が血液脳関門を傷害し、脳浮腫を惹起する可能性について調べる。

(4)新規バイオマーカー候補であるキヌレニン・キノリン酸は低分子であり、簡便な測定キットは存在しない。診療での応用を

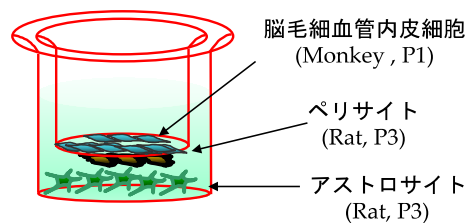
考え、測定キットの開発を目指す。

3. 研究の方法

(1)血清検体を用いたメタボローム解析は、インフルエンザ脳症 12 例(対照 22 例)、HHV-6 脳症 9 例(対照 27 例)で行った。その結果、3 種類の代謝物質が有意に上昇し、2 種類が有意に低下していた(計 5 種類)。HHV-6 脳症では 4 種類の代謝物質が有意に上昇し、9 種類が有意に低下していた(計 13 種類)。インフルエンザ脳症、HHV-6 脳症の解析で抽出した新規バイオマーカー候補のうち、キヌレニンは共通であり、神経毒性が報告されている代謝経路の中間代謝物であるため、病態との関連が示唆された。この下流の代謝物質であるキノリン酸は、HHV-6 脳症では有意差を認めしたが、インフルエンザ脳症では、有意差が検出されなかった。そのため、インフルエンザ脳症については、脳症 18 例、熱性けいれんを合併したインフルエンザ 12 例、熱性けいれんを合併しないインフルエンザ 25 例の 3 群間でキヌレニン・キノリン酸濃度の再検討を行った。

(2)ビーズ法を用いた測定系により血清検体中のサイトカイン(IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α)を測定した。

(3)2 つの脳症では、血液脳関門の傷害(透過性亢進)により脳浮腫が惹起される機序が想定されるため、サルの初代培養細胞による in vitro 血液脳関門組織モデル(BBB キット、ファーマコセル社)を応用して実験を行った。血液脳関門の機能は、経内皮的電気抵抗 (TEER)を測定することで評価した。具体的には、血管内皮側に相当するウェルの挿入内側の培養液にキヌレニンまたはキノリン酸を加え、TEER の経時的変化を測定。TEER の低下が認められて場合には、血液脳関門の機能が傷害されたと判断した(図 1)。



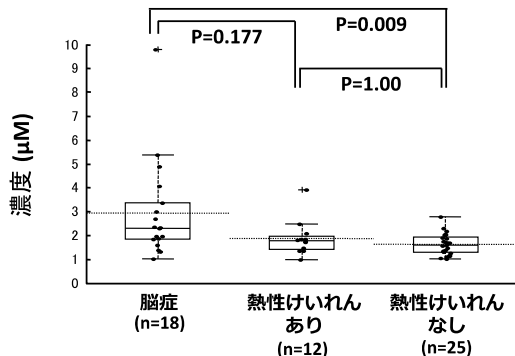
(図 1) 血液脳関門の試験管内再構成モデル

4. 研究成果

(1)インフルエンザ脳症 18 例、熱性けいれんを合併したインフルエンザ 12 例、熱性けいれんを合併しないインフルエンザ 25 例の 3 群間の血清中キヌレニン・キノリン酸濃度を図 2 に示す。血清中キヌレニン濃度は、インフルエンザ脳症において、熱性けいれんのな

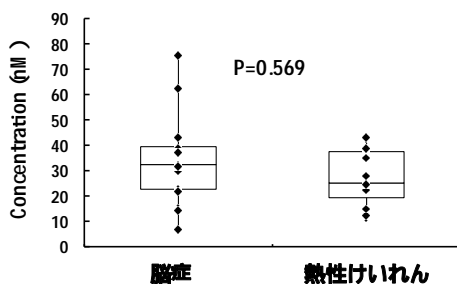
いインフルエンザ群と比較して、有意に高値であった(図 2)。血清中キノリン酸濃度は、症例数を増やした検討でも有意差が確認された(図 3)。

キヌレニン (血清)



(図 2) インフルエンザ脳症における血清中キヌレニン濃度

キノリン酸 (髄液)



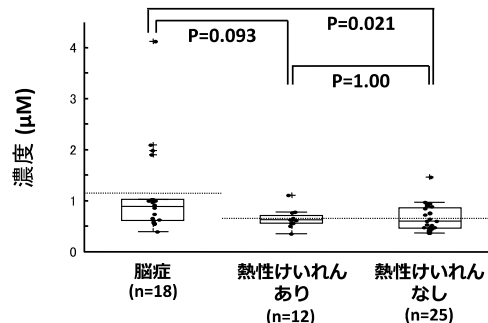
(図 3) インフルエンザ脳症における血清中キノリン酸濃度

一方、インフルエンザ脳症における髄液中のキノリン酸濃度は、熱性けいれん例との比較では、有意に高値ではなかった(図 4)。さらにキノリン酸の血清中濃度と髄液中濃度の相関では、有意な相関が認められた(図 5)。髄液中キノリン酸濃度は検討症例数が少なく、熱性けいれんのない症例との比較ができないために明確な結果は得られなかったが、脳症例の髄液中では上昇していることが示唆された。HHV-6 脳症例の髄液中キノリン酸濃度の検討では、脳症例において上昇していることを示唆する結果は得られなかった。

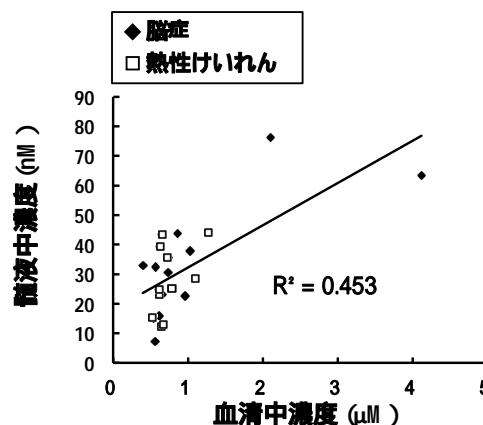
(2) 血清検体中のサイトカイン(IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α)を測定し、血清中のキヌレニン濃度との相関を調べたが、有意な相関を示す結果は得られなかった。

(3) 血液脳関門モデルを用いた実験から、キノリン酸は血液脳関門における透過性亢進を引き起こすことが示唆された(図 6)。

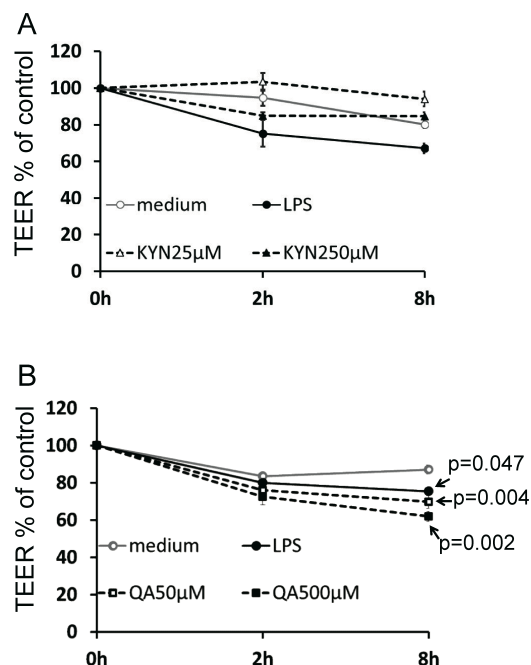
キノリン酸 (血清)



(図 4) インフルエンザ脳症における髄液中キノリン酸濃度



(図 5) インフルエンザ脳症における血清中キノリン酸濃度と髄液中キノリン酸濃度の相関



(図 6) 血液脳関門モデルによるキヌレニン・キノリン酸が TEER に与える影響の検討

(4) 臨床応用を目指すためにアッセイキット

の作成を継続している状況である。

以上から、インフルエンザ脳症・HHV-6 脳症の血清検体について、メタボローム解析を行い、キヌレニン・キノリン酸をバイオマーカー候補として抽出した。血液脳関門モデルにより、キノリン酸の病態への関与が示唆された。キヌレニン・キノリン酸は、他の神経疾患への関与が報告されており、簡易測定系の開発を継続し、臨床応用の可能性を検討意義があると考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- (1) Kawano Y, Kawada J, Kamiya Y, Suzuki M, Torii Y, Kimura H, Ito Y. Analysis of circulating human and viral microRNAs in patients with congenital cytomegalovirus infection. *J Perinatol*, 36(12):1101-1105, 2016. 査読有、DOI: 10.1038/jp.2016.157.
- (2) Ando S, Kawada J, Watanabe T, Suzuki M, Sato Y, Torii Y, Asai M, Goshima F, Murata T, Shimizu N, Ito Y, Kimura H. Tofacitinib Induces G1 Cell-Cycle Arrest and Inhibits Tumor Growth in Epstein-Barr Virus-Associated T and Natural Killer Cell Lymphoma Cells. *Oncotarget*, 7(47):76793-76805, 2016. 査読有、DOI: 10.18632/oncotarget.12529
- (3) Kawada J, Okuno Y, Torii Y, Okada R, Hayano S, Ando S, Kamiya Y, Kojima S, Ito Y. Identification of Viruses in Cases of Pediatric Acute Encephalitis and Encephalopathy Using Next-Generation Sequencing. *Sci Rep*, 6:33452, 2016. 査読有、DOI: 10.1038/srep33452
- (4) Ito Y, Suzuki M, Kawada J, Kimura H. Diagnostic values for the viral load in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic active Epstein-Barr virus disease. *J Infect Chemother*, 22(4):268-71, 2016. 査読有、DOI: 10.1016/j.jiac.2015.11.002
- (5) Kawano Y, Suzuki M, Kawada J, Kimura H, Kamei H, Ohnishi Y, Ono Y, Uchida H, Ogura Y, Ito Y. Effectiveness and safety of immunization with live-attenuated and inactivated vaccines for pediatric liver transplantation recipients. *Vaccine* 33(12):1440-5, 2015. 査読有、DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.01.075
- (6) Kawano Y, Kawada J, Ito Y. Epstein-Barr virus microRNAs in plasma as potential biomarkers for chronic infections. *J Infect Dis* 209(8):1298-300, 2014. 査読有、DOI: 10.1093/infdis/jit676

〔学会発表〕(計6件)

- (1) 堀場千尋、川田潤一、奥野友介、手塚宜行、鈴木高子、安藤将太郎、神谷泰子、鳥居ゆか、高橋義行、伊藤嘉規、小児血流感染症における病原微生物診断への次世代シーケンサーの応用、第48回日本小児感染症学会総会・学術集会、岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)、2016.11.19-20
- (2) Jun-ichi Kawada, Yusuke Okuno, Yuka Torii, Kazuhiro Horiba, Takako Suzuki, Shotaro Ando, Yasuko Kamiya, Yoshinori Ito, Next-generation sequencing for the identification of viruses in pediatric acute encephalitis and encephalopathy. IDSA 2016, New Orleans (USA), October 26-30
- (3) 伊藤嘉規、メタボローム解析が明らかにしたインフルエンザ脳症における新規バイオマーカー候補、第10回メタボロームシンポジウム、鶴岡メタボロームキャンパスレクチャーホール(山形県・鶴岡市)、2016.10.19-21
- (4) 川田潤一、鳥居ゆか、安藤将太郎、鈴木高子、神谷泰子、小島勢二、伊藤嘉規、次世代シーケンサーを用いた急性脳炎・脳症

の病原ウイルスの検出、第 119 回日本小児科学会学術集会、ロイトン札幌(北海道・札幌市)、2016.5.13-15

(5) 伊藤嘉規、鈴木道雄、川田潤一、木村宏、慢性活動性 EB ウイルス感染症における診断的意義のある末梢血単核球分画中ウイルス DNA 量の解析、第 47 回日本小児感染症学会、こらっせふくしま(福島県・福島市)、2015.10.31-11.1

(6) 鳥居ゆか、川田潤一、村田貴之、吉山裕規、鈴木道雄、木村宏、伊藤嘉規、EB ウイルスの単球細胞における Inflammasome 活性化の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)、2014.11.10-12

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 嘉規 (ITO, Yoshinori)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：20373491

(2) 研究分担者

川田 潤一 (KAWADA, Jun-ichi)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20532831